PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/31535
C07K 14/235, A61K 39/10	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Oktober 1996 (10.10.96)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00255

(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Januar 1996 (23.01.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 12 346.8 1. April 1995 (01.04.95) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Postfach 11 40, D-35001 Marburg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: LIST, Wolfgang [DE/DE]; Gunzelinweg 2, D-35043 Marburg (DE). SCHÜLER, Eckhard [DE/DE]; Ewiges Tal 3, D-35041 Marburg (DE). LENZ, Uwe [DE/DE]; Lärchenweg 7, D-35083 Wetter (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PROCESS FOR PURIFYING FILAMENTARY HAEMAGGLUTININ AND PERTUSSIS TOXIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON FILAMENTHÄMAGGLUTININ UND PERTUSSIS-TOXIN

(57) Abstract

The present invention concerns the purification of filamentary haemagglutinin (FHA) and pertussis toxin (PT) from a Bordetella pertussis (B. pertussis) culture filtrate by means of affinity and gel chromatography.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Reinigung von Filamenthämagglutinin (FHA) und Pertussis-Toxin (PT) aus einem Bordetella pertussis (B. pertussis) Kulturfiltrat mittels Affinitäts- und Gelchromatographie.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Reinigung von Filamenthämagglutinin und Pertussis-Toxin

Die vorliegende Erfindung betrifft die Reinigung von Filamenthämagglutinin (FHA) und Pertussis-Toxin (PT) aus einem Bordetella pertussis (B. pertussis) Kulturfiltrat mittels Affinitäts- und Gelchromatographie.

Der Erreger des Keuchhustens, B. pertussis, ist ein kleines, stäbchenförmiges, bekapseltes gram-negatives Bakterium, das keine Sporen bildet, unter aeroben Bedingungen kultiviert werden kann und im Vergleich zu anderen bakteriellen Krankheitserregern eine Vielzahl mehr oder minder gut charakterisierter Virulenzfaktoren bildet. Dazu gehören die äußeren Membranproteine (OMP), Lipopolysaccharide (LPS), Agglutinogene (AGG), Filamenthämagglutinin (FHA), Pertactin, ein 69 kD großer Strukturbaustein von B. Pertussis, Pertussis-Toxin (PT), Adenylylcyclase-Toxin (ACT), Trachea-Cytotoxin (TCT) und ein hitzelabiles Toxin (HLT). Zudem wurde gefunden, daß aus Kulturüberständen von B. pertussis isoliertes FHA heterogen ist (Irons L. J. (1983) J. Gen. Microbiol. 129, 2769-2778).

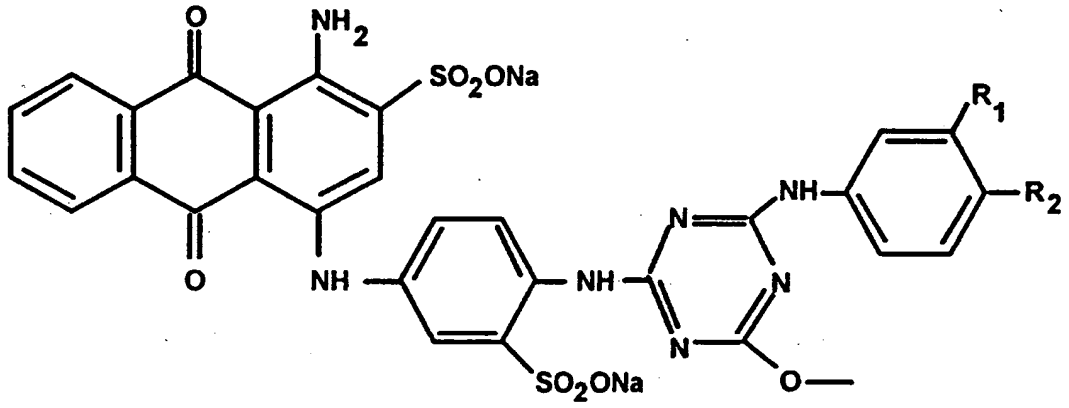
FHA wird von den Bakterien sezerniert und dient als Adhäsionsfaktor zur Anheftung der Bakterien an die Wirtszellen während der Infektion. FHA ist im allgemeinen ein 3261 Aminosäuren langes und ca. 332 kD schweres Protein. PT, ein wesentlicher Virulenzfaktor, besitzt eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, ist im allgemeinen 1007 Aminosäuren lang und ein ca. 110 kD schweres Protein. Es ist nun auch bekannt, daß FHA und PT allein oder in Kombination mit o.g. Virulenzfaktoren von B. pertussis gegen Keuchhusten einen ausreichenden Schutz gewährleisten.

Zur Immunisierung gegen B. pertussis gibt es verschiedene Impfstoffe. Zum einen werden ganze, abgetötete B. pertussis Organismen verwendet und zum anderen Vakzine aus Kulturüberständen, sogenannte azelluläre Pertussis-Impfstoffe. Diese Impfstoffe zeichnen sich insbesondere durch eine gute Verträglichkeit aus.

Es gibt nun verschiedene Verfahren, die Antigene FHA und PT aus Kulturüberständen von B. pertussis zu isolieren. Viele Methoden besitzen als einen Reinigungsschritt eine Affinitätschromatographie mit dem Protein Fetuin als Affinitätsligand, an den PT bindet (z.B. Skelton, S.K. & Wong, K. H. (1990) J. Clin. Microbiol., 1062 - 1065; Sekura, R. D. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 14647 - 14651, No. 23). Ein wesentlicher Nachteil dieser Chromatographie ist jedoch, daß durch das "Bluten" der Säule die Vakzine mit einem Fremdprotein, nämlich Fetuin, verunreinigt wird, das eine unerwünschte allergische Reaktion nach der Impfung auslösen kann. Andere Verfahren enthalten mehrere Chromatographieschritte, z.B. Chromatographie an Hydroxylapatit, gefolgt von Chromatographie an Butyl-TSK, Trisacryl Blue und Sephacryl S-200® HR (EP-A1-0 427 462), welche die produktionsmäßige Herstellung der Vakzine verteuern. Im Gegensatz hierzu erzielt man mit Verfahren mit wenigen Chromatographieschritten, z.B. gemäß dem Verfahren von Arai, H. et al. (1979), Infect. Immun. 25, 460 - 462, nur geringe Ausbeuten an FHA, welches zudem mit ungewünschtem B. pertussis Endotoxin verunreinigt ist (siehe EP-B1-0 159 003, Seite 3, Zeilen 29 - 32). Im allgemeinen führen Reinigungsverfahren mit nur einem Chromatographieschritt zu keiner ausreichenden Auftrennung der einzelnen Virulenzfaktoren (siehe z.B. Dias, W. O. et al. (1994) Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 27 (11) 2607 - 2611).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein wirtschaftliches Verfahren zu finden, das FHA und PT in guten Ausbeuten und ohne wesentliche Verunreinigung mit anderen B. pertussis Antigenen oder Fremdproteinen, wie z.B. Fetuin, gewinnen läßt.

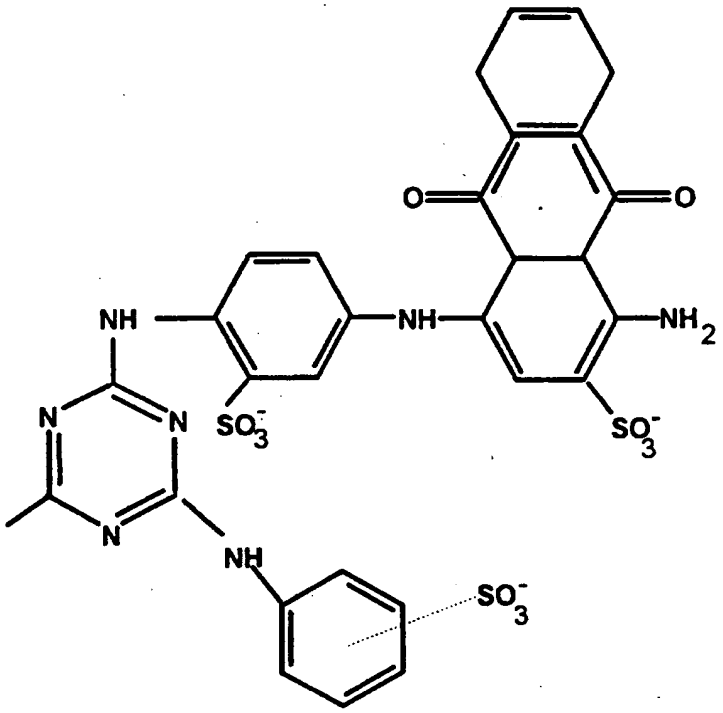
Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren, bei dem FHA und/oder PT aus einer B. pertussis Fermentationsbrühe oder zellfreiem Kulturüberstand mittels (a) einer Farbstoffaffinitätschromatographie, insbesondere einer Triazinfarbstoffaffinitätschromatographie, vor allem eine mit blauem Farbstoff, z.B. Cibacron Blue der Formel



R1 = H or SO_2ONa

R2 = SO_2ONa or H

oder Blue Trisacryl Plus der Formel



vor allem Blue Sepharose®, insbesondere Blue Sepharose 6 Fast Flow® (Pharmacia, Uppsala, Schweden) oder Blue Hyper D® (BioSepra GmbH, Frankfurt, Deutschland) oder funktionelle Äquivalente davon; und (b) einer Gelfiltration. Für die Gelfiltration kann jedes Gelmaterial, vorzugsweise Sephacryl® oder Superdex ® (Pharmacia, Uppsala Schweden) insbesondere Sephacryl S 200® Superdex 75 ® oder Superdex 200pg® verwendet werden. Als funktionelle Äquivalente sind vorzugsweise solche zu verstehen, die eine funktionelle und/oder strukturelle Ähnlichkeit mit Nukleotiden, insbesondere Adenin oder NAD, besitzen, da PT eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität besitzt und folglich derartige Nukleotide binden kann.

Die Fraktionierung von FHA und/oder PT an der Farbstoffaffinitätschromatographie erfolgt vorzugsweise mit zweiwertigen Kationen, insbesondere Mg^{2+}. Als Puffer eignet sich z.B. Tris-Puffer mit einem pH-Wert von ungefähr 7 - 8, insbesondere

ungefähr 7. Die Fraktionierung von FHA und/oder PT mittels Gelfiltration erfolgt ebenso vorzugsweise mit zweiwertigen Kationen, insbesondere Mg^{2+}. Als Puffer eignet sich hier z.B. Acetatpuffer mit einem pH-Wert von ungefähr 3 - 5, insbesondere 4 - 4,5.

Es ist auch vorteilhaft, wenn die Fermentationsbrühe bzw. der zellfreie Kulturüberstand vor der weiteren Reinigung konzentriert wird, beispielsweise durch Ultrakonzentration über Membranfilter.

Die Fermentation von B. pertussis erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren, z.B. gemäß einem Verfahren von Andorn, N. et al. (1988) Appl. Microbiol Biotechnol. 28, 356 - 360. Es eignen sich jedoch auch andere in der einschlägigen Literatur beschriebene Verfahren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Vakzine-Zusammensetzung enthaltend FHA und/oder PT und gegebenenfalls ein Adjuvants. Hierzu ist es notwendig, daß insbesondere PT detoxifiziert wird. Als Detoxifizierungsagentien eignen sich vorzugsweise chemische Mittel, insbesondere Formalin, Glutaraldehyd, Hydrogenperoxid oder Tetranitromethan. Zur Detoxifizierung eignen sich Verfahren wie z.B. in WO 87/07507, WO 91/12020, EP-B1-0 047 802, EP-B1-0 269 729 oder EP-A1-0 377 114 beschrieben. Als Adjuvans eignen sich beispielsweise Adjuvantien wie in WO 90/14837 beschrieben.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Multikomponenten-Vakzine, welche FHA und/oder PT und/oder weitere Antigene, z.B. die oben beschriebenen B. pertussis Virulenzfaktoren und/oder Diphtherie-, Tetanus-, Hepatitis-B-Antigene u.a. enthält (siehe z.B. WO 94/03206, EP-A1-0 267 998, EP-A2-0 462 534). Hierzu werden die weiteren Antigene zu dem nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigten FHA und/oder PT gegebenenfalls unter Zugabe eines geeigneten Adjuvants hinzugegeben. Eine besonders bevorzugte Vakzinekombination enthält Diphtherie-, Tetanus- und Pertussisantigene.

Die Eingangsdosis ist hierbei vorzugsweise 3 - 10 Lf, die bis zu 2 mal nach jeweils 1 bis 2 Monaten und einmal nach 5 bis 10 Jahren wiederholt wird. Ein Lf (limes floculationis; Flockungseinheit) entspricht der Antigenmenge, die durch eine internationale Antitoxineinheit gebunden wird. Dies ist im in vitro Test als Ausflockung zu erkennen. Die Applikation kann beispielsweise oral oder nasal gemäß EP-A-0 544 612 oder parenteral (siehe z.B. WO 88/03809) erfolgen.

Beispiele

1. Fermentation

Eine Kultur von B. pertussis Stamm 165 (Sekura, R. D. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 14647 - 14651, No. 23) wurde in modifiziertem Stainer-Scholte Medium gemäß Andorn, N. et al. (1988) Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 256 - 360 bei 35°C kultiviert. Am Ende der Kultivierung wurden die festen Kulturbestandteile mittels eines Separators abgetrennt und das Klärfiltrat mit Ultrakonzentrierungsmembranen konzentriert. Das Ultrafiltrat der Konzentrierung wurde verworfen. Anschließend wurde das Ultrakonzentrat über Membranfilter (0,65 - 0,45 µm) klar filtriert.

2. Reinigung

2.1. Affinitätschromatographie

Das auf pH 6,0 eingestellte Kulturfiltrat wurde auf die mit Natriumphosphatpuffer (0,25 mol/l Natriumphosphat, pH 6,0) äquilibrierte Blue Sepharose 6FF® (Pharmacia, Uppsala Schweden) Affinitätssäule aufgetragen und FHA und PT zusammen in einer Fraktion mit Tris-Puffer (0,05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1,5 M Magnesiumchlorid, pH 7,0) eluiert.

2.2. Gelfiltration

Das Eluat der Affinitätssäule wurde auf die mit Natriumacetat-Puffer (0,01 mol/l Natriumacetat-3-hydrat, 0,05 mol/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat, pH 4,0) äquilibrierte Superdex 200 pg® (Pharmacia, Uppsala Schweden) Gelfiltrationssäule aufgetragen und FHA und PT mit dem Natriumacetat-Puffer als getrennte Fraktionen eluiert. Die Reinheit der mit diesem Verfahren gewonnenen Antigene FHA und PT beträgt jeweils über 90 %.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung von Filamenthämagglutinin (FHA) und/oder Pertussistoxin (PT) aus einer B. pertussis Fermentationsbrühe oder zellfreiem Kulturüberstand, bestehend aus folgenden Schritten:

   (a) Fraktionierung der genannten Fermentationsbrühe oder des zellfreien Kulturüberstandes mittels einer Farbstoffaffinitätschromatographie; und

   (b) Fraktionierung des Eluates aus Schritt (a) mittels Gelfiltration.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Fermentationsbrühe oder der zellfreie Kulturüberstand vor der ersten Fraktionierung konzentriert wird.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Farbstoffaffinitätschromatographie eine Triazinfarbstoffaffinitätschromatographie verwendet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß blauer Farbstoff bei der Farbstoffaffinitätschromatographie, insbesondere Cibacron Blue oder Blue Trisacryl Plus, vor allem Blue Sepharose 6FF® (Pharmacia) oder Blue-Hyper D® (BioSepra) oder ein funktionelles Äquivalent davon verwendet wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Sephacryl® oder Superdex® (Pharmacia) bei der Gelfiltration, insbesondere Sephacryl S 200, Superdex 75 oder Superdex 200 pg verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß FHA und/oder PT mit zweiwertigen Kationen eluiert wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Elutionspuffer der Farbstoffaffinitätschromatographie einen pH-Wert von ungefähr 7 - 8, insbesondere ungefähr 7 hat und/oder der Elutionspuffer der Gelfiltration einen pH-Wert von ungefähr 3 bis 5, insbesondere ungefähr 4 bis 4,5.

8. Verfahren zur Herstellung einer Vakzine-Zusammensetzung enthaltend FHA und/oder PT, dadurch gekennzeichnet, daß

   (a) FHA und/oder PT nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 gereinigt wird;

   (b) das gereinigte PT detoxifiziert wird; und

   (c) das gereinigte FHA aus Schritt (a) und detoxifizierte PT aus Schritt (b) zusammengegeben werden.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Detoxifizierung von PT chemisch, insbesondere durch Formalin, Glutaraldehyd, Hydrogenperoxid oder Tetranitromethan erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein Adjuvans hinzugegeben wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß ein weiteres Antigen hinzugegeben wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das weitere Antigen ausgewählt wird aus der Gruppe Pertactin, Diphtherie-Antigen und Tetanus-Antigen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 96/00255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/235 A61K39/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 437 687 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 24 July 1991 see the whole document ---	1-12
Y	INFECT IMMUN 41 (1). 1983. 313-320, XP002001811 SATO Y ET AL: "SEPARATION AND PURIFICATION OF THE HEM AGGLUTININS FROM BORDETELLA - PERTUSSIS." see the whole document ---	1-12
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 May 1996	10.05.96

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Moreau, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 96/00255

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. CLIN. MICROBIOL. (1990), 28(5), 1062-5, 1990, XP000568833 SKELTON, STEPHEN K. ET AL: "Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from Bordetella pertussis by hydrophobic and affinity interaction" cited in the application see the whole document	1-12
Y	EP,A,0 427 462 (SMITH-KLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 15 May 1991 cited in the application see the whole document	1-12
Y	EP,A,0 159 003 (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST) 23 October 1985 cited in the application see the whole document	1-12

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte[illegible]nal Application No
PCT/EP 96/00255

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-437687	24-07-91	US-A-	5276142	04-01-94
		AU-B-	641711	30-09-93
		AU-B-	6793390	13-06-91
		CA-A-	2031763	12-06-91
		JP-A-	3191789	21-08-91
EP-A-427462	15-05-91	AT-T-	134194	15-02-96
		AU-B-	635083	11-03-93
		AU-B-	6584690	09-05-91
		CA-A-	2029201	07-05-91
		DE-D-	69025375	28-03-96
		JP-A-	3169893	23-07-91
		US-A-	5391715	21-02-95
EP-A-0159003	23-10-85	JP-B-	1001445	11-01-89
		JP-C-	1524783	12-10-89
		JP-A-	60218326	01-11-85
		JP-B-	1001446	11-01-89
		JP-C-	1524785	12-10-89
		JP-A-	60226822	12-11-85
		JP-B-	1001447	11-01-89
		JP-C-	1524786	12-10-89
		JP-A-	60237027	25-11-85
		AU-B-	571078	31-03-88
		AU-B-	4122385	17-10-85
		CA-A-	1237998	14-06-88
		US-A-	4563303	07-01-86

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 96/00255

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/235 A61K39/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 437 687 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 24.Juli 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-12
Y	INFECT IMMUN 41 (1). 1983. 313-320, XP002001811 SATO Y ET AL: "SEPARATION AND PURIFICATION OF THE HEM AGGLUTININS FROM BORDETELLA - PERTUSSIS." siehe das ganze Dokument ---	1-12
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
2.Mai 1996	10.05.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Moreau, J

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 96/00255

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	J. CLIN. MICROBIOL. (1990), 28(5), 1062-5, 1990, XP000568833 SKELTON, STEPHEN K. ET AL: "Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from Bordetella pertussis by hydrophobic and affinity interaction" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-12
Y	EP,A,0 427 462 (SMITH-KLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 15.Mai 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-12
Y	EP,A,0 159 003 (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST) 23.Oktober 1985 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-12

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlich. .n, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter .nales Aktenzeichen
PCT/EP 96/00255

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-437687	24-07-91	US-A-	5276142	04-01-94
		AU-B-	641711	30-09-93
		AU-B-	6793390	13-06-91
		CA-A-	2031763	12-06-91
		JP-A-	3191789	21-08-91
EP-A-427462	15-05-91	AT-T-	134194	15-02-96
		AU-B-	635083	11-03-93
		AU-B-	6584690	09-05-91
		CA-A-	2029201	07-05-91
		DE-D-	69025375	28-03-96
		JP-A-	3169893	23-07-91
		US-A-	5391715	21-02-95
EP-A-0159003	23-10-85	JP-B-	1001445	11-01-89
		JP-C-	1524783	12-10-89
		JP-A-	60218326	01-11-85
		JP-B-	1001446	11-01-89
		JP-C-	1524785	12-10-89
		JP-A-	60226822	12-11-85
		JP-B-	1001447	11-01-89
		JP-C-	1524786	12-10-89
		JP-A-	60237027	25-11-85
		AU-B-	571078	31-03-88
		AU-B-	4122385	17-10-85
		CA-A-	1237998	14-06-88
		US-A-	4563303	07-01-86